

# Meat consumption and cancer risk : an epidemiological analysis from multiple perspectives

Citation for published version (APA):

Gilsing, A. M. J. (2014). *Meat consumption and cancer risk : an epidemiological analysis from multiple perspectives*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20141218ag>

## Document status and date:

Published: 01/01/2014

## DOI:

[10.26481/dis.20141218ag](https://doi.org/10.26481/dis.20141218ag)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

# S

## Summary / Samenvatting

**ENGLISH SUMMARY**

Since the early ecological evidence in the seventies of the last century suggested that meat consumption was associated with the risk of (especially colorectal) cancer, hundreds of individual-level epidemiological studies have reported on the relation between meat and cancer. However, despite these scientific efforts, the effect of meat consumption on cancer risk remains a controversial issue.

For this reason, this thesis set out to investigate the association between meat consumption and cancer risk using a multi-dimensional epidemiological approach. The first chapters of this thesis focus on vegetarian and low meat dietary patterns in relation to cancer risk, whereas specific mechanisms of meat-related carcinogenesis (i.e. dietary fat, heterocyclic amines (HCAs), polycyclic aromatic hydrocarbons (HCAs), nitrite/nitrate, and heme iron) are examined in the second part of this thesis.

**PART A: A Dietary Pattern Approach**

This section starts with two studies on meat consumption patterns and non-cancer health outcomes because these may, in turn, affect the association between low meat diets and cancer risk.

It is well-accepted that a large body size is associated with an increased risk of many cancers, but the association between meat consumption and prospective weight gain remains to be elucidated. In **Chapter 2**, we assessed the association between meat consumption at baseline and change in BMI over six and 14 y of follow-up using data from the population based Netherlands Cohort Study (NLCS). At baseline, all participants filled out a questionnaire on dietary habits, anthropometry, and other risk factors for cancer. The NLCS is a case-cohort design with a subcohort of 5000 individuals randomly selected from the larger cohort on recruitment into the study. Follow-up of the subcohort has allowed for the additional accumulation of prospective data regarding risk factors for cancer including body weight. This subcohort was the study population used in this chapter. We showed that total meat consumption at baseline was positively associated with BMI at baseline, but it did not strongly affect subsequent weight gain over a 14 y period. Nonetheless, modest differential BMI change effects were observed for some subtypes of meat. Results remained similar when stratifying on median baseline BMI.

Individuals following a vegetarian or vegan diet are likely at higher risk of developing nutrient deficiencies i.e. vitamin B12. This vitamin is naturally present only in foods of animal origin. In **Chapter 3** of this thesis we therefore investigated whether vegans and strict vegetarians were at an increased risk of developing a deficiency. We used cross-sectional data from the large European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Oxford cohort to show that mean serum vitamin B12 was highest among omnivores (n=226), intermediate in vegetarians (n=231), and lowest in vegans (n=232). Nearly half of the vegans were categorized as vitamin B12 deficient and would be expected to have a higher risk of developing clinical symptoms related to vitamin B12 deficiency. There was no significant association between age or duration of adherence to a vegetarian or a vegan diet and vitamin B12. Based on these findings, both vegetarians and vegans should ensure a regular intake of sufficient vitamin B12 from fortified foods and/or supplements.

The few prospective cohort studies that were specifically set out to study cancer incidence in vegetarians have reported mixed results. In addition, no study has examined the effects of low meat consumption on cancer risk. In order to study how a vegetarian and low meat diet (i.e. meat 1 day/week) influences the risk of cancer compared to a more common high meat diet, we extracted the NLCS-Meat Investigation Cohort (NLCS-MIC) from the total NLCS cohort. The NLCS was followed up for cancer incidence through linkage to the Netherlands Cancer Registry, and the Netherlands Pathology Registry. The NLCS aimed to over-represent vegetarians and low meat consumers at recruitment by intentionally contacting them through health food shops and magazines. By using the extensive dietary data from the FFQ, we were able to classify vegetarians based on self-reporting (1 question) as well as on the more accurate and extensive FFQ data. As a result, the NLCS-MIC was defined by combining all FFQ-confirmed vegetarians (n=702), pescetarians (n=394) and 1 day/week meat consumers (n=1396) from the total NLCS cohort, with a random sample of 2-5 days/week and 6-7 days/week meat consumers (n=2965 and 5648, respectively). Consequently, we could not only study vegetarianism and low meat consumption in relation to major cancer outcomes (colorectal, lung, female breast and prostate) but were also able to investigate the reliability of self-defined vegetarianism.

In line with our expectations, a baseline comparison of the NLCS-MIC (**Chapter 4**) indicated that vegetarians, pescetarians, and individuals consuming meat for 1 day/week had a more favorable distribution of (non-)dietary cancer risk factors (e.g. high intakes of fruit and vegetables, lower smoking rates) compared to regular meat consumers (defined as individuals who eat meat for 6-7 days/week). Additionally, we observed that as much as 50% of all the individuals who classified themselves as vegetarian (based on 1 item on the first page of the questionnaire) reported (some) meat or fish consumption on the extensive FFQ. However, the misclassification that occurred in terms of baseline diet (other than meat) and lifestyle characteristics using these self-reports was relatively small. We showed that the proportion of prevalent cancer cases was highest among the vegetarians and pescetarians and significantly decreased with increasing meat intake. This suggests that such selection mechanisms should be taken into consideration in etiologic studies.

We then investigated the association between these meat consumption groups and colorectal cancer risk in **Chapter 5** in the NLCS-MIC. After 20.3 years of follow-up and exclusion of prevalent cancer cases, 437 colorectal cancer cases (307 colon, 92 rectal) were available for analyses. Compared to high meat consumers, both non- and low meat consumers had a non-significantly decreased risk of colorectal, especially rectal, cancer which attenuated after adjustment for confounders. In fact, most of the differences in risk estimates between these meat consumption groups could be explained by differences in dietary pattern other than meat intake. No statistically significant differences in colorectal cancer risk between vegetarians and non-vegetarians were observed, but the inverse association was stronger using FFQ-confirmed vegetarian status over self-defined status.

**Chapter 6** describes the association between meat consumption group and the risk of lung, female breast and advanced and overall prostate cancer using data from the NLCS-MIC after 20.3 y of follow-up. In age- and sex adjusted analyses, a statistically significant reduced risk of lung cancer for vegetarians and pescetarians was found when compared with 6-7 days/week meat consumers (Hazard Ratio (HR): 0.44, 95% confidence interval

(CI): 0.21-0.94, and HR: 0.28, 95%CI: 0.09-0.88 respectively). However, further adjustment for confounding (especially smoking) attenuated these associations such that they were no longer significant (HR: 0.85 and 0.54, respectively). Vegetarians, pescetarians and 1 day/week meat consumers did not have a reduced risk female breast and overall prostate cancer compared to individuals consuming meat on a daily basis. Our unexpected observation that  $\leq 1$  day/week meat consumption was associated with increased risk of advanced prostate cancer warrants investigation in other studies.

### **PART B: A Mechanistic Approach**

In the second part of this thesis, we set out to study each of the proposed mechanisms of meat-related carcinogenicity in relation to the cancer endpoints most likely to be affected.

Dietary fat, particularly saturated fat, has long been suspected to be responsible for the meat-cancer association. However, epidemiological studies have been inconsistent and intervention studies aimed at lowering total fat intake failed to confirm any association with cancer risk except for cancer of the ovaries. By performing a case-cohort analysis in the total NLCS cohort, we did not find evidence that fat from fresh and processed meats increased the risk of ovarian cancer after 16.3 y of follow-up (**Chapter 7**). Neither did we find a clear dose response association for animal fat, saturated fat, or total fat which may be present in high quantities in a meat-rich diet. The multi-variable HR for the highest compared to the lowest quintile of trans-unsaturated fatty acid intake was 1.51 (95%CI: 1.04-2.20; P-trend=0.01). This type of fat, however, does not stem from meat, but from margarines, packaged baked products and fast foods.

Specific meat mutagens, including HCAs, PAHs, and N-nitroso compounds (NOCs), may be involved in colorectal carcinogenesis depending on their activation or detoxification by phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes (XME). Because large scale studies are lacking we wanted to investigate the interplay between five meat mutagens and genetic variation in 18 XME genes in relation to advanced colorectal adenoma, and colorectal cancer (**Chapter 8**). To this extent we performed two nested case control studies in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. Dietary intake of meat mutagens was assessed using a food frequency questionnaire (FFQ) with a detailed meat-cooking module. After adjusting for multiple testing we observed one interaction between HCA 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) intake and a NAT1 polymorphism in the adenoma study. Despite that this was the largest and most comprehensive study to date, genetic variation in XME genes could not explain as much of the association between meat carcinogen intake and colorectal neoplasia as expected a priori. This is a common issue in many comparable hypothesis driven G×E interaction studies. However, the study of G×E interactions is a rapidly developing discipline and much effort is being put into developing new study designs, gene/SNP selection strategies, and methods of analysis to increase statistical power.

It has been suggested that the positive association between red meat consumption and colorectal cancer can be explained by the high heme iron content of red meat. Because heme iron has shown to promote specific mutations, we set out to link heme iron data to colorectal cancer with specific mutations in key-genes. For this study, which is described in **Chapter 9** we used data from the total NLCS cohort. After 7.3 y of follow-up, tumor tissue

samples were collected for nearly all colorectal cancer cases based on which KRAS and APC mutation status and P53 expression status could be determined. The results from this research support the hypothesis that heme iron increases the risk of colorectal cancer. Heme iron intake was associated with an increased risk of colorectal tumors harboring G>A transitions in KRAS and APC and overexpression of P53. No associations were found with CRC harboring G>T mutations in KRAS or APC. These novel findings suggest that alkylating rather than oxidative DNA damaging mechanisms are involved in heme-induced colorectal carcinogenesis. In addition, it illustrates that novel molecular pathological epidemiology techniques can lead to a better understanding of the underlying pathways.

This thesis concludes with a summary of the main findings, a discussion about the limitations, and implications for future research (**Chapter 10**). We illustrate that meat consumption is a complex exposure variable that calls for multiple approaches when studying its association with cancer risk. Overall, our results suggest do not support a strong association between meat consumption and the major cancers under study. When compared to individuals consuming meat on a daily basis, our univariate analyses suggest that vegetarians and low meat consumers were at a reduced the risk of lung and colorectal cancer, respectively, but this effect attenuated and lost statistical significance after correction for confounders. We paid specific interest to issues relating to confounding when studying the health effects of vegetarian and low meat diets since we showed that these populations exhibit a number of other potential cancer preventive factors and behaviors next to the (near) avoidance of meat. Our observation that heme iron may promote colorectal cancer risk through specific alkylating mechanisms provides important new mechanistic evidence that red meat consumption may indeed be a risk factor for colorectal cancer.

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

In de jaren zeventig van de vorige eeuw suggereerde ecologisch onderzoek dat een hoge vleesconsumptie mogelijk geassocieerd was met een hoger risico op (met name darm-) kanker. Sindsdien zijn er honderden epidemiologische studies op het individuele niveau uitgevoerd om de relatie tussen vlees en kanker beter te kwantificeren. Ondanks deze wetenschappelijke inspanningen blijft de relatie tussen vleesconsumptie en het risico op kanker controversieel.

Om deze reden heeft dit proefschrift als doel de associatie tussen vleesconsumptie en het kankerrisico verder te onderzoeken. Hiervoor is gebruik gemaakt van een epidemiologische benadering vanuit een tweetal perspectieven. In de eerste hoofdstukken gaat de aandacht uit naar de relatie tussen vegetarische en laag vlees voedingspatronen en het risico op kanker. In het tweede deel van dit proefschrift is gekeken naar specifieke mechanismes waarop vlees het risico op kanker kan beïnvloeden (de hoeveelheid vet, heterocyclische amines (HCAs), polyaromatische koolwaterstoffen (PAKs), nitraat/nitriet, en heemijzer).

### DEEL A: Een voedingspatroon benadering

Deze sectie start met twee studies naar de relatie tussen vleesconsumptie en niet-kanker gerelateerde gezondheidseffecten zoals gewichtstoename en vitamine B12 deficiënties. Deze gezondheidseffecten kunnen namelijk op hun beurt de relatie tussen vleesconsumptie en kanker mogelijk beïnvloeden.

Alhoewel over het algemeen wordt aangenomen dat een hoog lichaamsgewicht het risico op veel verschillende type kankers verhoogd, is er nog maar weinig bekend over de relatie tussen vleesconsumptie en gewichtstoename over de tijd. In **hoofdstuk 2**, hebben we bekeken hoe vleesconsumptie (gemeten aan de start van het onderzoek) gerelateerd is aan veranderingen in de Body Mass Index (BMI in  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) na 14 jaar follow-up. Dit onderzoek is uitgevoerd binnen de Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS). Bij aanvang van de studie in 1986 hebben alle 120.852 deelnemers een vragenlijst ingevuld over eetgewoonte (middels een voedselfrequentievragenlijst (FFQ)), antropometrie, en andere risicofactoren voor kanker. De NLCS hanteert een case-cohort benadering wat inhoudt dat bij aanvang van het onderzoek, na de beginmeting, een subcohort van 5000 personen willekeurig is geselecteerd. Van dit subcohort is na zes en 14 jaar follow-up extra informatie verzameld over lichaamsgewicht. Met behulp van deze gegevens hebben wij aangetoond dat de totale vleesconsumptie bij aanvang van de studie in 1986 sterk positief geassocieerd was met de BMI op dat zelfde tijdstip. De totale vleesconsumptie heeft echter geen sterke invloed op gewichtstoename over de daaropvolgende periode van 14 jaar. Desalniettemin vonden wij enkele bescheiden indicaties dat sommige subtypes van vlees een verschillend effect op de verandering in BMI hebben.

Personen die een vegetarisch of veganistisch dieet volgen hebben mogelijk een grotere kans op het ontwikkelen van voedingsdeficiënties zoals een vitamine B12 tekort. Deze vitamine is alleen aanwezig in voedsel van dierlijke oorsprong. In **hoofdstuk 3** van dit proefschrift hebben we daarom gekeken of vegetariërs en veganisten een verhoogd risico hebben op een dergelijk tekort. We hebben daarvoor gebruik gemaakt van cross-sectionele data van het grote 'European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)

Oxford' cohort. Daarin hebben we aangetoond dat serum vitamine B12 waardes het hoogste waren in vleeseters (n=226), gemiddelde waardes hadden in vegetariërs (n=231) en het laagste waren in veganisten (232). Bijna de helft van alle veganisten werd geclassificeerd als vitamine B12 deficiënt en heeft naar verwachting een groter risico op het ontwikkelen van klinische symptomen die gerelateerd zijn aan een vitamine B12 deficiëntie. Wij vonden geen significante relatie tussen de leeftijd, duur van het vegetarische of veganistisch dieet en bloed waardes van vitamine B12. Gebaseerd op deze bevindingen zouden zowel vegetariërs en veganisten er voor moeten zorgen voldoende vitamine B12 uit verrijkte voeding en/of voedingssupplementen binnen te krijgen.

Het beperkte aantal prospectieve cohort studies dat speciaal is opgezet om naar kankerincidentie in vegetariërs te kijken heeft tot dusver gemengde resultaten opgeleverd. Daarnaast heeft geen enkele studie gekeken wat de relatie is tussen een lage vlees consumptie (gedefinieerd als één dag per week vlees) en het risico op kanker. Om te onderzoeken hoe een vegetarische en een laag vlees dieet het risico op kanker beïnvloedt in vergelijking met een meer gebruikelijk hoog vlees dieet, hebben wij het NLCS-Meat Investigation Cohort (NLCS-MIC) geëxtraheerd uit het totale NLCS cohort. Het NLCS cohort is opgevolgd om nieuwe kanker patiënten over de tijd te kunnen identificeren. Bij de opzet van het onderzoek is getracht het aantal vegetariërs en mensen met een lage vleesinname te vergroten door deze doelgroep te benaderen via gezondheidsbladen en reformwinkels. Door de uitgebreide dataverzameling, waren wij in staat om vegetariërs zowel te classificeren op basis van zelfrapportage (één vraag) en op basis van meer gedetailleerde FFQ. NLCS-MIC is uiteindelijk gecreëerd door alle 'FFQ-bevestigde'- vegetariërs (n=702), -pescetariërs (oftewel viseters) (n=394), en 1 dag/week vleeseters (n=1396) uit het totale NLCS-cohort te combineren met een random sample van personen die 2-5 dagen/week en 6-7 dagen/week vlees eten (respectievelijk n=2965 en 5648). Als direct gevolg hiervan konden wij niet alleen onderzoeken hoe een vegetarisch- en laag vlees dieet het risico op kanker beïnvloedt, maar ook hoe betrouwbaar de zelfrapportage van de vegetarische leefstijl is.

In de lijn der verwachting toonde een baseline vergelijking van het NLCS-MIC cohort in **hoofdstuk 4** aan dat vegetariërs, pescetariërs, en personen die slechts 1 dag/week vlees eten een gunstiger profiel van kankerrisicofactoren hadden (bijvoorbeeld een hogere inname van groente en fruit, lagere prevalentie van roken) in vergelijking met personen die (bijna) dagelijks vlees aten. Daarnaast vonden wij dat 50% van de personen die zichzelf als vegetariër classificeert toch aangeeft vis en/of vlees te eten op de uitgebreide FFQ. De misclassificatie die optreedt in termen van baseline voedselinname en leefstijlfactoren wanneer men gebruik maakt van zelfrapportage is echter relatief klein. Daarnaast zagen wij dat de proportie personen die op de baseline vragenlijst rapporteerde een kanker te hebben (gehad) het grootste was onder de vegetariërs en pescetariërs. Deze proportie nam verder significant af naar mate men meer vlees rapporteert te eten. Dit suggereert dat in etiologisch onderzoek rekening dient te moeten worden gehouden met dergelijke onderliggende bias.

Vervolgens onderzochten we in **hoofdstuk 5** de associatie tussen deze vleesconsumptie groepen en het risico op colorectaal kanker in NLCS-MIC. Na 20.3 jaar follow-up, en exclusie van deelnemers die rapporteerde kanker te hebben (gehad) op de baseline vragenlijst,



bleven er 437 colorectalkanker patiënten (307 colon, 92 rectaal) over voor de analyses. Zowel vegetariërs als laag vlees eters hadden een niet significant verlaagd risico op op colorectaal, voornamelijk rectaal, kanker in vergelijking met personen die veel vlees eten. Dit effect werd minder sterk wanneer er voor confounders werd gecorrigeerd. De meeste verschillen in risicoschattingen tussen de vleesconsumptie groepen kon worden verklaard door verschillen in voedselconsumptie anders dan vleesinname. Wij observeerde geen statistisch significante verschillen in colorectalkanker risico tussen vegetariërs en niet-vegetariërs. De inverse associaties waren echter wel sterker wanneer we voor de classificatie van vegetariërs gebruik maakten van de FFQ data in plaats van zelfrapportage.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de relatie tussen vleesconsumptie groep en het risico op longkanker, borstkanker (alleen vrouwen), en gevorderd- en totaal prostaatkanker. Voor deze analyses werd wederom gebruik gemaakt van gegevens van het NLCS-MIC cohort na 20.3 jaar follow-up. In de univariate analyses hadden vegetariërs een meer dan twee keer zo laag statistisch significant risico op longkanker in vergelijking met personen die 6-7 dagen per week vlees eten. Voor de groep pescetariërs was dit risico 3.5 keer zo laag. Wanneer we echter ook corrigeerde voor confounding (voornamelijk roken) attenuerde deze risicoschattingen en waren deze niet meer significant. Vegetariërs, pescetariërs en 1 dag/week vlees eters hadden geen verlaagd risico op borstkanker en totaal prostaatkanker in vergelijking met personen die dagelijks vlees eten. Wij zijn de eerste die rapporteren over de relatie tussen vleesconsumptie groep en gevorderd prostaatkanker risico. De onverwachte observatie dat mannen die  $\leq 1$  dag/week vlees aten een verhoogd risico op gevorderd prostaatkanker hebben vraagt om verder onderzoek in andere studies.

#### **DEEL B: Een mechanistische benadering**

Het tweede deel van dit proefschrift had als doel te onderzoeken via welke mechanismes vlees mogelijk het risico op kanker verhoogd. Hierbij hebben wij enkele specifieke vleescarcinogenen onderzocht in relatie tot het kanker eindpunt waar deze het meest waarschijnlijk mee is geassocieerd.

Het is lang gesuggereerd dat voedingsvet, en voornamelijk verzadigd vet, verantwoordelijk zou zijn voor de relatie tussen vleesconsumptie en het risico op kanker. Epidemiologische studies hebben echter inconsistente resultaten opgeleverd en interventiestudies gericht op het verlagen van de vetinname hebben ook geen risicoverlagende effect aangetoond, behalve voor kanker aan de eierstokken. In **hoofdstuk 7** beschrijven wij een case-cohort analyse in het totale NLCS-cohort waarbinnen wij geen bewijs hebben gevonden dat vet uit vers vlees en/of vleeswaren het risico op eierstokkanker na 16.3 jaar follow-up beïnvloed. Wij vonden ook geen duidelijke dosis effect relatie voor dierlijk vet, verzadigd vet en totaal vet, welke allen in grote mate aanwezig kunnen zijn een een vleesrijk voedingspatroon. Vrouwen met de hoogste inname van *trans*verzadigde vetzuren hadden een 50% statistisch significant hoger risico op ovariumkanker dan vrouwen met de laagste inname na correctie voor confounders. Dit type vet is echter niet afkomstig uit vlees maar uit margarines en fastfood.

Specifieke vleescarcinogenen, zoals de heterocyclische amines (HCAs), polyaromatische koolwaterstoffen (PAKs), en *N*-nitroso verbindingen (NOCs), zijn mogelijk betrokken in het ontstaan van darmkanker. De kankerverwekkende werking van deze componenten is

afhankelijk van hun activatie en detoxificatie door fase I en II xenobiotica-metaboliserende enzymen (XME). Hier is echter nog weinig onderzoek naar gedaan in grootschalige epidemiologische studies. Om deze reden wilden wij in **hoofdstuk 8** onderzoeken wat de gecombineerde effecten van de bovengenoemde vleescarcinogenen en genetische varianten in 18 XME genen zijn in relatie tot het risico op poliepen in de dikke darm en dikke darmkanker. Hiertoe zijn twee geneste patiëntcontrole onderzoeken (één bij patiënten met poliepen en één bij patiënten met colorectaal kanker) uitgevoerd binnen de “Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial”. Voedingsinname van de vleescarcinogenen was bepaald doormiddel van een FFQ met een gedetailleerde vleesbereidingsmodule. Na correctie voor multiple testing vonden wij één interactie tussen de HCA 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) en een polymorfisme in het NAT1 gen in de poliepstudie. Ondanks dat dit de grootste en meest uitgebreide studie was die tot dusver was uitgevoerd, kon genetische variatie in XME genen slechts in beperkte mate de associatie tussen vleescarcinogeen inname en colorectale neoplasie verklaren.

Het is gesuggereerd dat het positieve verband tussen rood vlees consumptie en het risico op colorectaal kanker kan worden verklaard door de hoge concentratie heem ijzer in dit type vlees. Omdat experimenteel onderzoek heeft aangetoond dat blootstelling aan heemijzer specifieke mutaties in het DNA kan veroorzaken, hebben wij onderzocht of heemijzer inname geassocieerd was met specifieke mutaties in darmkankergenomen. Voor deze studie, welke beschreven is in **hoofdstuk 9**, hebben wij gebruik gemaakt van gegevens van het totale NLCS cohort. Na 7.3 jaar follow-up is DNA geïsoleerd uit de tumor van bijna alle darmkankerpatiënten. In dit tumor DNA is zowel de mutatie status van het *KRAS* en *APC* gen, en de expressie van P53 bepaald. De resultaten van dit onderzoek bekrachtigen de hypothese dat heemijzer het risico op colorectalkanker verhoogt. Heemijzer was geassocieerd met een verhoogd risico op colorectalkanker gekenmerkt door G-naar-A mutaties in *KRAS* en *APC* en overexpressie van P53. Er werd geen verband gevonden tussen heemijzer en het risico op darmkanker met G-naar-T mutaties in *KRAS* en *APC*. Deze nieuwe bevindingen suggereren dat het kanker verhogende effect van heemijzer mogelijk wordt veroorzaakt door alkylatie en niet door andere mechanismes.

Dit proefschrift eindigt met een samenvatting van de belangrijkste bevindingen, een discussie over de limitaties en implicaties voor toekomstig onderzoek (**hoofdstuk 10**). Vleesconsumptie is een complexe leefstijl welke vanuit verschillende invalshoeken dient te worden onderzocht wanneer men het risico tussen vlees en kanker wil bestuderen. Onze resultaten laten geen sterk verband zien tussen vleesconsumptie en het risico op de onderzochte kankers. Uit onze univariate analyses blijkt dat in vergelijking tot personen die dagelijks vlees eten, vegetariërs en laag vleeseters een lager risico hebben op respectievelijk long- en colorectalkanker. Echter deze resultaten verzwakken en zijn niet langer statistisch significant wanneer we corrigeren voor confounders. In ons onderzoek hebben wij speciale aandacht besteed aan het begrip confounding omdat vegetariërs en laag vleeseters ook vaak een ander leefstijl en voedingspatroon hebben, buiten het (niet) eten van vlees als zodanig. Deze confounders kunnen op hen beurt ook het risico op kanker kan beïnvloeden. Onze observatie dat heemijzer mogelijk het risico op colorectalkanker vergroot door specifieke alkylerende mechanismen, verschaft belangrijk nieuwe mechanistisch bewijs dat rood vlees inderdaad een risicofactor is voor colorectalkanker.